

Special Instructions for Evidence Copy Box Identification

Documents in this patent application scanned prior to the scan date of this document may not have a box number present in the database. The documents are in the same box as this paper. If the patent application documents that do not have a box number are stored in more than one box, a copy of this form is placed in each box. Check the database box number for each copy of this form to identify all the evidence copy box numbers for documents that do not have a box number.



The documents stored in this box are original application papers scanned and endorsed by PACR and imported into IFW.



The documents stored in this box were scanned into the IFW prototype for GAU 1634, 2827, or 2834.

Indexer, place an X in only one box above to indicate the documents placed in this box that were previously scanned in PACR or IFW and will not be scanned again.

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平5-505877

⑬ 公表 平成5年(1993)8月26日

⑭ Int. Cl.⁹ 識別記号 庁内整理番号 審査請求 未請求
 G 01 N 27/447 7731-4H G 01 N 27/28 3 1 5
 C 07 K 3/14 7235-2J 3 1 5 Z (全 5 頁)
 7235-2J

⑮ 発明の名称 トリス-タウリネート-ホルメート緩衝系と好適な均一電気泳動プレートとを用いた均一ゲル状中での SDS 電気泳動による蛋白質分離

⑯ 特 願 平3-513838

⑰ 翻訳文提出日 平4(1992)4月27日

⑱ 出 願 平3(1991)8月20日

⑲ 国際出願 PCT/DE91/00660

⑳ 国際公開番号 WO92/04625

㉑ 国際公開日 平4(1992)3月19日

優先権主張 ㉒ 1990年8月29日 ㉓ ドイツ(DE) ㉔ P4027333.4

㉕ 発 明 者 ミコフ, ブデイン ドイツ連邦共和国 フレイジング 8050, ケプセアストラツセ 21
 A

㉖ 出 願 人 ミコフ, ブデイン ドイツ連邦共和国 フレイジング 8050, ケプセアストラツセ 21
 A

㉗ 代 理 人 弁理士 福村 直樹

㉘ 指 定 国 A T (広域特許), B E (広域特許), C H (広域特許), D E (広域特許), D K (広域特許), E S (広域特許), F R (広域特許), G B (広域特許), G R (広域特許), I T (広域特許), J P, L U (広域特許), N L (広域特許), S E (広域特許), U S

請求の範囲

1. 支持体又は支持組織上のゲルが共にトリス-ホルメート-タウリネート緩衝系を含む均一な分離用ゲル層及び均一な試料用ゲル層からなる電気泳動プレートの均一ゲル層の上に(蛋白質分離のための)蛋白質混合物の水溶液を載置し、ゲル上に2つの導電電極片を載置した後、直流電流を印加し、標準的手順に従い SDS 電気泳動を行うことを特徴とする SDS 電気泳動による蛋白質分離方法。
2. 試料用ゲル層が濃度 0.02~0.05、好ましくは 0.04 で均一濃度 4~5%、好ましくは 5% のポリアクリルアミドと、グリセリンを 30% 含むトリス-ホルメート-タウリネート緩衝系とからなる電気泳動プレートを使用することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。
3. 分離用ゲル層が濃度 0.02~0.05、好ましくは 0.04 で均一濃度 8~24%、好ましくは 12% のポリアクリルアミドと、グリセリンを 10% 含むトリス-ホルメート-タウリネート緩衝系とからなる電気泳動プレートを使用することを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。
4. 支持体としてゲルに対向する面が親水性である厚さ約 0.2 mm のポリエステルフィルム又はポリエステル若しくはガラスファイバーからなる網状体を使用した電気泳動プレートを用いることを特徴とする請求項 1~3 のいずれかに記載の方法。
5. 試料用ゲル層及び分離用ゲル層の緩衝系が、0.1~0.5 モル/リットル (1.21~7.27%)、好ましくは 0.388 モル/リットル (4.71%) のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン (TRIS) と、0.1~0.4 モル/リットル (0.38~1.52%)、好ましくは 0.3 モル/リットル (1.14%) の磷酸と、0.001~0.004 モル/リットル (0.03~0.12%)、好ましくは 0.002 モル/リットル

- (0.08%) のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) とからなり、各々 7.0~8.5、好ましくは 7.8 の pH 値を有することを特徴とする請求項 1~4 のいずれかに記載の方法。
6. 導電電極片が、0.2~1.2 モル/リットル (2.42~12.11%)、好ましくは 0.588 モル/リットル (7.13%) の TRIS と、0.2~1.6 モル/リットル (2.5~15.02%)、好ましくは 0.802 モル/リットル (10.04%) のクウリンと、0.002~0.01 モル/リットル (0.06~0.29%)、好ましくは 0.007 モル/リットル (0.20%) の SDS とからなり、8.0~9.0、好ましくは 8.5 の pH 値を有するカソード緩衝剤と、0.4~1.6 モル/リットル (4.85~19.38%)、好ましくは 1.295 モル/リットル (15.89%) の TRIS と、0.25~1.50 モル/リットル (0.95~5.72%)、好ましくは 1.0 モル/リットル (3.61%) の磷酸と、0.002~0.01 モル/リットル (0.06~0.29%)、好ましくは 0.007 モル/リットル (0.20%) の SDS とからなり、7.0~8.5、好ましくは 7.8 の pH 値を有するアノード緩衝剤を含むことを特徴とする請求項 1~5 のいずれかに記載の方法。
 7. SDS 電気泳動が水平、垂直又は 2 次元電気泳動として実施されることを特徴とする請求項 1~6 のいずれかに記載の方法。
 8. SDS 電気泳動が 50~500 V の電圧を 0.5~2 時間印加して実施されることを特徴とする請求項 1~7 のいずれかに記載の方法。
 9. SDS 電気泳動が分析式電気泳動又は吸着式電気泳動として実施されることを特徴とする請求項 1~8 のいずれかに記載の方法。
 10. グルタルジアルデヒドを 0.5%、エタノールを 50% 含む溶液で 2~3 回 (50℃ の温度又は室温で 10~15 分間) 電気泳動プレートを処理することにより、SDS 電気泳動の終了時に

蛋白質の固定を行い、次いで固定された蛋白質を染色液で染色することを特徴とする請求項1～9のいずれかに記載の方法。

11. 特に請求項1～10のいずれかによるSDS電気泳動により蛋白質分離を行うための均一電気泳動プレートであって、支持体又は支持組織とその上に設置される試料用ゲル層及び分離用ゲル層とからなり、該試料用ゲル層及び分離用ゲル層が共にトリス-ホルメート-タウリネート緩衝系を含み、かつそれぞれ濾紙電極片を支持することを特徴とする電気泳動プレート。

12. 試料用ゲル層が濃度0.02～0.05、好ましくは0.04で均一濃度4～5%、好ましくは5%のポリアクリルアミドと、グリセリンを30%含むトリス-ホルメート-タウリネート緩衝系とからなることを特徴とする請求項11記載の電気泳動プレート。

13. 分離用ゲル層が濃度0.02～0.05、好ましくは0.04で均一濃度8～20%、好ましくは12%のポリアクリルアミドと、グリセリンを10%含むトリス-ホルメート-タウリネート緩衝系とからなることを特徴とする請求項11又は12に記載の電気泳動プレート。

14. 試料用ゲル層及び分離用ゲル層の緩衝系が、0.1～0.8モル/リットル(1.21～7.27%)、好ましくは0.389モル/リットル(4.71%)のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TRIS)と、0.1～0.4モル/リットル(0.38～1.52%)、好ましくは0.3モル/リットル00(1.14%)の酪酸と、0.001～0.004モル/リットル(0.03～0.12%)、好ましくは0.002モル/リットル(0.06%)のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)とからなり、7.0～8.5、好ましくは7.8のpH値を有することを特徴とする請求項11～13のいずれかに記載の電気泳動プレート。

15. 濾紙電極片が、0.2～1.2モル/リットル(2.42～12.11%)、好ましくは0.589モル/リットル(7.13

明 細 書

トリス-タウリネート-ホルメート緩衝系と好適な均一電気泳動プレートとを用いた均一ゲル中でのSDS電気泳動による蛋白質分離

本発明は、新規なトリス-ホルメート-タウリネート緩衝系と好適な均一電気泳動プレートとを用いた均一ゲル中でのSDS電気泳動による蛋白質分離に関するものである。

洗剤であるドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を用いたSDS電気泳動は分子量に基づいて高分離度の蛋白質分離を行う比較的低廉な方法である。

いくつかの異なるSDS電気泳動法が知られている。例えばファルマシア・エルケービー(Pharmacia LKB)社はSDS電気泳動を行うための、トリス-アセート-トリシネート緩衝系(エクセルゲル[ExcelGel])を含むSDS勾配ブリキャストゲル及びポリアクリルアミド電極片を製造している。エクセルゲルは全ポリアクリルアミド濃度が5%で濃度Cが0.03の恒持用ゲルと、全ポリアクリルアミド濃度が8～18%の範囲で連続的に変化しかつ濃度が0.03の分離用ゲルを含んでいる。

上記ブリキャスト勾配ポリアクリルアミド(8～18%) SDSゲルは、その製造に多大な注意と時間を要するという欠点があった。その結果、これらの製品は高価となり、また、不規則的に乾燥するためゲルがその支持体又は支持組織とともに性じれてしまう。さらに、エクセルゲル中に含まれるトリス-アセート-トリシネート緩衝系は緩衝pH値が7.1であり、トリスイオンのpK_a値8.2、酢酸のpK_a値4.8及びトリシンのpK_a値8.0から離れているため緩衝能力が低い。

本発明の目的は、より安価かつより簡単に製造される均一ゲルを使用してSDS電気泳動法を改良すること及びより高い緩衝能力を

%)のTRISと、0.2～1.6モル/リットル(2.5～15.02%)、好ましくは0.802モル/リットル(10.04%)のタウリンと、0.002～0.01モル/リットル(0.06～0.29%)、好ましくは0.007モル/リットル(0.20%)のSDSとからなり、8.0～9.0、好ましくは8.5のpH値を有するカソード緩衝系と、0.4～1.8モル/リットル(4.85～19.38%)、好ましくは1.295モル/リットル(15.59%)のTRISと、0.25～1.50モル/リットル(0.95～5.72%)、好ましくは1.0モル/リットル(3.81%)の酪酸と、0.002～0.01モル/リットル(0.06～0.29%)、好ましくは0.007モル/リットル(0.20%)のSDSとからなり、7.0～8.5、好ましくは7.8のpH値を有するアノード緩衝系を含むことを特徴とする請求項11～14のいずれかに記載の電気泳動プレート。

16. SDS電気泳動を用いて蛋白質分離を行うために、請求項11～15のいずれかの均一電気泳動プレートを使用する方法。

もつ新規な緩衝系を開発することにある。

上記問題は、ポリアクリルアミドの濃度が4～24%の特定範囲でその濃度が0.02～0.05、好ましくは0.04の均一な試料用ゲル及び均一な分離用ゲルと、緩衝pH値が8.0～9.0、好ましくは8.5の範囲にあり、かつトリスイオンのpH値8.2とタウリンのpH値8.9に極めて近いトリス-ホルメート-タウリネート緩衝系とを組み合わせてSDS電気泳動を行うことにより解決され、この緩衝系は注目すべき高い緩衝能力を示すことが判明した。

均一なブリキャストゲルと新しいタイプのトリス-ホルメート-タウリネート緩衝系を用いてSDS電気泳動を行うここに記載した新規な方法は、労力を省き費用がかかる公知の濃度勾配SDSブリキャストゲルの調製を省き、蛋白質分離法を改良するものである。本発明によれば、使用する均一ゲルの製造は容易であり、かつ技術的に簡単であるので、SDS電気泳動法のコストが低減できる。

本発明によれば、均一な試料用ゲル及び均一な分離用ゲル中のポリアクリルアミド(アクリルアミドとビスアクリルアミドのポリマー)の濃度はそれぞれ4～5%、好ましくは5%と、8～24%、好ましくは12%で、濃度は0.02～0.05、好ましくは0.04である。

公知のエクセルゲル緩衝系の低い緩衝能力を増加させるために、ホルメートイオン(酪酸のイオン)がリーディングイオンとして、タウリネートイオン(タウリンのイオン)がトレーリングイオンとして、トリスイオン(トリスのイオン)が対イオンとして緩衝するトリス-ホルメート-タウリネート緩衝系を開発した。この緩衝系の緩衝pH値は8.0～9.0、好ましくは8.5であるため、トリスイオンのpK_a値8.2及びタウリンのpK_a値8.9に近い。

緩衝の代わりに酢酸等の同様な弱酸、又は酪酸等の強酸を使用することができる。また、タウリンの代わりにタウリン誘導体及び

アミノメタンスルホン酸、3-アミノプロピオン酸、アラニン、 β -アラニン、2-アミノエタンホスホン酸、2-アミノエチルスルホン酸、システイン、セリン、スレオニン等の同様な化合物を使用することができる。

本発明の目的の一つは、分離すべき蛋白質混合物の水溶液を、共にトリス-ホルメート-タウリネート緩衝系を含み、支持体又は支持組織に貼り付けられた均一な試料用ゲル層及び均一な分離用ゲル層からなる電気泳動ゲルの上に設置し、2つの濾紙電極片を設けた後、直接電流を印加し、SDS電気泳動を通常に実施すると同様に行うことを特徴とするSDS電気泳動による蛋白質分離方法を開示することにある。

本発明のもう一つの目的は、上記方法を適用したSDS電気泳動による蛋白質分析に使用される均一な電気泳動プレートを開示することにある。この電気泳動プレートは、共にトリス-ホルメート-タウリネート緩衝系を含みかつそれぞれ濾紙電極片を支持する試料用ゲル層及び分離用ゲル層に設置された支持体又は支持組織からなる。

使用する電気泳動プレートは、試料ゲル層が濃度0.04で均一濃度5%のポリアクリルアミドと、グリセリンを30%含むトリス-ホルメート-タウリネート緩衝系とを含むことが好ましい。分離ゲル層は、濃度0.04で均一濃度12%のポリアクリルアミドと、グリセリンを10%含むトリス-ホルメート-タウリネート緩衝系とを含むことが好ましい。

支持体又は支持組織としては、約0.2mm厚のポリエステルフィルム又はポリエステル若しくはガラスファイバーからなる膜状体が、親水性の面をゲル層に向けて使用される。

試料用ゲル層及び分離用ゲル層の各緩衝系は、0.1~0.6モル/リットル(1.21~7.27%)、好ましくは0.389モル/リットル(4.71%)のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TRIS)と、0.1~0.4モル/リットル

(0.38~1.52%)、好ましくは0.3モル/リットル(1.14%)の酪酸と、0.001~0.004モル/リットル(0.03~0.12%)、好ましくは0.002モル/リットル(0.08%)のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)とからなり、各々7.0~8.5、好ましくは7.8のpH値を有する。

濾紙電極片は、0.2~1.2モル/リットル(2.42~12.11%)、好ましくは0.589モル/リットル(7.13%)のTRISと、0.2~1.8モル/リットル(2.5~15.02%)、好ましくは0.802モル/リットル(10.04%)のタウリンと、0.002~0.01モル/リットル(0.08~0.29%)、好ましくは0.007モル/リットル(0.20%)のSDSとからなり、8.0~9.0、好ましくは8.5のpH値を有するカソード緩衝系と；0.4~1.8モル/リットル(4.85~19.38%)、好ましくは1.295モル/リットル(15.89%)のTRISと、0.25~1.50モル/リットル(0.95~5.72%)、好ましくは1.0モル/リットル(3.81%)の酪酸と、0.002~0.01モル/リットル(0.08~0.29%)、好ましくは0.007モル/リットル(0.20%)のSDSとからなり、7.0~8.5、好ましくは7.8のpH値を有するアノード緩衝系を含む。

本発明によるSDS電気泳動は、水平、垂直及び2次元電気泳動として実施でき、また分析式電気泳動及び採取式(プロットング)電気泳動として実施できる。SDS電気泳動の終了後、分離した蛋白質は標準の手順に従って固定し染色液を使用して染色することができる。SDS電気泳動では50~600Vの電圧を0.5~2時間印加する。

本発明によれば、例えば、肝臓、筋肉、脾臓、ビーナッフ、グロブリン、タマネギ、ソラ豆、レンズ豆、エンドウ豆、ヒマワリの種、ハシバミの葉から異なった蛋白質を分離することができる。そ

れらの濃度は0.125~0.250ミリg/ミリリットルとなる。SDS電気泳動を行う前に蛋白質は変性させ、SDSと混合させなければならない。

SDS電気泳動の後、蛋白質はグルタルジアルデヒド0.5%と、エタノール50%を含む溶液を用いて2、3回、60℃で10~15分間ゲルを処理することにより固定する。

蛋白質の染色は染色液、好ましくはクマシーブリアントブルーR250の溶液又は藍溶液を用いて行う。

分離すべき蛋白質を有する試料は濾布用片の助けにより試料ゲル上に1~20マイクロリットルの量で塗布される。一つのゲルプレート上には50個まで試料を塗布することができる。

本発明によるSDS電気泳動は、分子量が6000~450000の範囲の蛋白質を迅速かつ効果的に分離できる。得られたバンドは公知のSDS電気泳動システムで得られたものに比べ、よりはっきりと分離され、蛋白質混合物は極めて高い分離度でより多くのバンド数に分離される。

本発明による均一な電気泳動プレートは以下に述べるような簡単な技術的手段により製造することができる(図1及び図2)。

透明なプレキシガラス・ボックス(図1)内に複数のガラス板を次々と密にかつスペーサ片(0.25~1.0mm、好ましくは0.5mm厚)によって分離して配置する。スペーサ片はガラス板に貼着する。ゲル固定フィルム又はゲル固定膜状体はガラス板及びスペーサ片の間にゆるく固定する。チューブ(図2)を通して緩衝液(水)を箱内に底から充填する。次に、試料ゲル溶液を同じチューブを通して緩衝液の下に導入する。アトメチルエチレンサルフェート(TMEDA、TEMED)、アンモニウムパーオキソジサルフェート[(NH₄)₂S₂O₈]のごとき公知の触媒を使用して標準的な手順により試料ゲルを15分間重合させた後、試料ゲルは極めて平滑な上表面を得る。ゲルの上の緩衝液(水)を例えばウォーターポンプにより除去した後、用ゲルを形成する

ための分離ゲル溶液を上から注入する。上述したように、分離ゲルを重合した後、ゲル層はゲル固定フィルム又はゲル固定膜状体とともにプラスチックフィルムに結合する。このようにして得られた均一ゲルは室温で少なくとも12ヶ月保存することができる。

カソード濾紙電極片及びアノード濾紙電極片は6mmの同じ厚さを有するが、長さ及び幅は異なり、例えば、長さ及び幅は280mm×12.5mmとすることができる。カソード濾紙電極片はカソード緩衝剤を含み、アノード濾紙電極片はアノード緩衝剤を含む(上記参照)。これら濾紙電極片は室温で少なくとも12ヶ月保存することができる。

以下本発明の実施例を説明する。これらの実施例では異なる濃度の分離用ゲルの均一SDSブリキャストゲルを製造するための組成となっている。

ゲル層の組成は異なる特性の層を得るために変化させることができる。母材はポリアクリルアミドからなり、試料用ゲル層(T=5%, C=0.04)は全ゲル層の1/4~1/3を占め、分離用ゲル層(T=8, 10, 12, 14, 16, 18, 20%, C=0.04)は全ゲル層の3/4~2/3を占めている。ブリキャストゲルの支持体はポリエステルフィルム(0.2mm)又はポリエステル若しくはガラスファイバーからなる膜状体(80μm)である。ゲル層は室温で保存することができ、それらの寿命は少なくとも12ヶ月である。ゲル層緩衝剤の組成を表1に詳細に示す。

表1 分離ゲル緩衝剤の組成

T%	8	10	12	14	16	18	20
pH	8.18	8.07	7.93	7.78	7.61	7.40	7.14
TRIS g	5.38	5.70	5.15	4.71	4.36	4.08	3.88
酪酸 ml	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91
SDS g	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06

(水で100mlに希釈)

カソード緩衝剤及びアノード緩衝剤の組成を表2及び表3に詳細に示す。

表2 カソード緩衝剤の組成

T%	8	10	12	14	16	18	20
pH	8.70	8.63	8.55	8.47	8.38	8.27	8.13
TRIS g	15.04	11.96	8.35	7.13	5.25	3.89	2.40
タウリン g	10.04	10.04	10.04	10.04	10.04	10.04	10.04
SDS g	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20

(水で100mlに希釈)

表3 アノード緩衝剤の組成

T%	8	10	12	14	16	18	20
pH	8.19	8.07	7.93	7.78	7.61	7.40	7.14
TRIS g	21.28	19.01	17.17	15.69	14.51	13.61	12.94
塩酸 ml	3.61	3.81	3.81	3.81	3.81	3.81	3.81
SDS g	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20

(水で100mlに希釈)

要 約 書

本発明は新しいタイプのトリス-ホルメート-タウリネート緩衝系によるSDS電気泳動を用いた蛋白質分離に使用する方法及び均一な電気泳動プレートを得る。

図 1

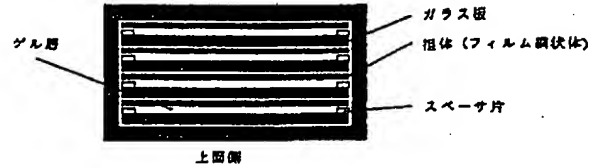
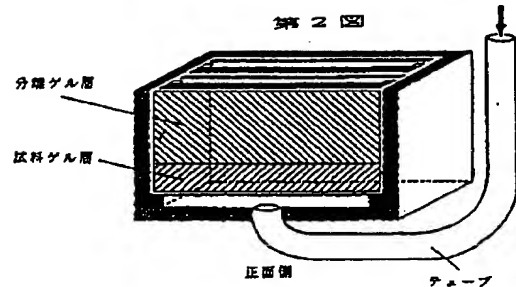


図 2



国際調査報告

International Application No. PCT/DE 91/00560		
1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER in terms of classification symbols alone, without any "According to International Patent Classification (IPC) or to any Revised Classification and (PS)		
Int. Cl. ⁵	G 01 N 27/26, C 07 K 3/14	
2. FIELD SEARCHED		
3. DOCUMENTS RELEVANT TO THE INVENTION		
Int. Cl. ⁵ G 01 N: C 07 K; B 01 D		
4. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Character of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant category **	Relevant to Claim No. #
A	US, A, 4481094 (A. FERNANDEZ DE CASTRO ET AL.) 6 November 1984, see the whole document	1-16
A	US, A, 4415655 (AURORA F. DE CASTRO ET AL.) 15 November 1983, see the whole document	1-16
5. STATEMENT OF THE INVENTOR		
6. CERTIFICATION		
Date of the Admitt. Certificate of the International Bureau 13 November 1991 (13.11.91)		Date of Entry of the International Search Report 4 December 1991 (04.12.91)
International Searching Authority European Patent Office		Signature of International Officer

国 際 調 査 報 告

PCT/DE 91/00660

SA 50322

This report lists the patent family members referring to the patent document cited in the abstracted document. The members are as presented in the European Patent Office (EPO) file as of 27/09/01. The European Patent Office is an in very short for the purpose of this report.

Patent document cited in European patent	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A- 4481094	06/11/84	NONE	
US-A- 4415655	15/11/83	NONE	

For more details about this report, see Official Journal of the European Patent Office, No. 13/90

EPO FORM P4171